

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 07224061 A

(43) Date of publication of application: 22.08.95

(51) Int. Cl **C07D413/04**
G01N 21/76
//(C07D413/04 , C07D207:16 ,
C07D271:12)

(21) Application number: 06047644
(22) Date of filing: 09.02.94

(71) Applicant: KOKURITSU EISEI SHIKENJO
(72) Inventor: TOYOOKA TOSHIMASA
RIYUU ICHIMEI
ANDO MASANORI

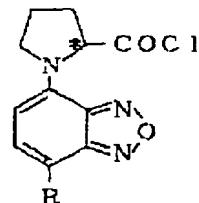
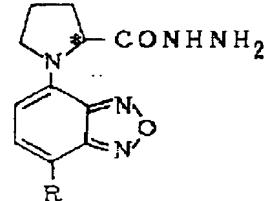
(54) NEW OPTICALLY ACTIVE DERIVATIVE OF
4-(2-CARBAZOYL PYRROLIDIN-1-YL)-2,1,3-BENZ
OXADIAZOLE

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new optically active derivative having high selective reactivity with aldehydes and ketones and useful as a fluorescent labeling re agent for the detection and determination of an optical isomer containing carbonyl group in high sensitivity.

CONSTITUTION: This 4-(2-carbazoylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole is expressed by formula I [R is $\text{SO}_2\text{NR}_1\text{R}_2$ (R_1 and R_2 each is H or a lower alkyl) or NO_2 ; atom marked with * is asymmetric center], e.g. (+)-or (-)-4-(2-carbazoylpyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole. The compound of formula I can be produced e.g. by reacting (+)- or (-)-4-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole of formula II with hydrazine.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-224061

(43)公開日 平成7年(1995)8月22日

(51)Int.Cl.⁶
C 0 7 D 413/04
G 0 1 N 21/76
// (C 0 7 D 413/04
207:16
271:12)

識別記号 庁内整理番号
2 0 7

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数2 書面 (全7頁)

(21)出願番号 特願平6-47644

(22)出願日 平成6年(1994)2月9日

(71)出願人 591275757

国立衛生試験所長

東京都世田谷区上用賀1丁目18番1号

(72)発明者 豊岡 利正

神奈川県横浜市栄区小菅ヶ谷町2000-10-
2-201

(72)発明者 劉 一鳴

東京都世田谷区桜3-8-17 マリーナ桜
402号

(72)発明者 安藤 正典

神奈川県横浜市緑区もえぎ野10-44

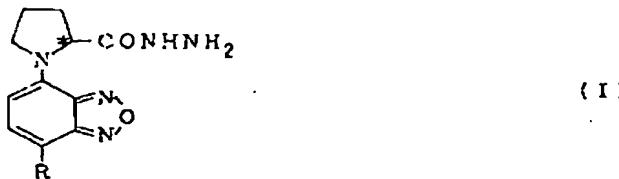
(74)代理人 弁理士 川上 宣男

(54)【発明の名称】 4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサシアゾールの新規
光学活性誘導体

(57)【要約】 (修正有)

【目的】アルデヒドおよびケトン等のカルボニル基を有する化合物の検出・定量に用いられる蛍光標識試薬を提供する。

【構成】一般式(I)で表わされる4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサシアゾールの新規光学活性誘導体およびその光学活性誘導体からなるアルデヒドおよびケトン類のための分析用蛍光標識試薬。



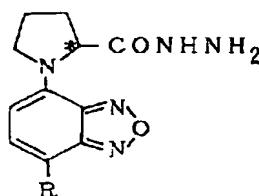
(式中RはSO₂NR₁R₂ (ただし、R₁、R₂は、それぞれ水素原子または低級アルキルである) またはNO₂であり、*は不斉中心を意味する。)

【効果】式(I)の化合物はカルボニル基に対して選択的で反応性が高く、アルデヒドおよびケトン類に対する

蛍光試薬として極めて優れている。また、未反応の蛍光試薬等に影響されることなく、カルボニル基を含む光学活性体を高感度で分離定量できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I)

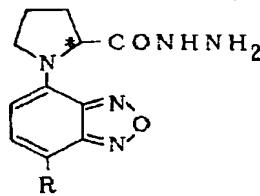


(式中RはSO₂NR₁R₂（ただし、R₁、R₂は、それぞれ水素原子または低級アルキルである）、またはNO₂であり、*は不斉中心を意味する。）で表わされる4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-

*【化1】

*

(I)



(式中RはSO₂NR₁R₂（ただし、R₁、R₂は、それぞれ水素原子または低級アルキルである）、またはNO₂であり、*は不斉中心を意味する。）で表わされる4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールの光学活性誘導体からなることを特徴とするアルデヒドおよびケトン類のための分析用蛍光標識試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】本発明は、アルデヒドおよびケトン等のカルボニル基を含有する化合物の検出、定量の際に蛍光標識試薬として用いることのできる4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールの新規な光学活性誘導体に関する。

【0002】

【背景技術】アルデヒドおよびケトン類を検出、定量する際の蛍光標識試薬としては、従来、ダンシルヒドラジン [Kawasaki, T. 等J. Chromatogr., 226, 1 (1981)]、O-(アンスリルメチル)ヒドロキシルアミン類やアンスラセンカルボン酸ヒドラジド類 [Goto, J. 等Anal. Sci., 5, 399 (1989)]、DMEQ-ヒドラジド [Yamaguchi, M. 等Analyst, 115, 1363 (1990)]、ヒドラジノ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール類 [Uzu, S. 等Analyst, 115, 1477 (1990)]、Fmoc-ヒドラジン [Zhang, R-E. 等Anal. Biochem., 195, 160 (1991)]等が知られている。これらの試薬による方法は、特異性が高く、ケトン

※2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾールの新規光学活性誘導体。

【請求項2】 一般式 (I)

【化2】

(I)

類の検出限界においてもサブピコモルのオーダであり良好であるが、標識化反応条件が苛酷であったり、試薬や生成した誘導体の安定性が悪く、常に一定の測定結果は得難いという問題がある。

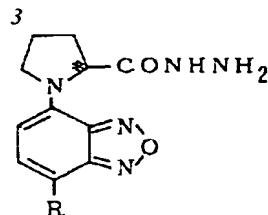
【0003】一方、光学異性体の形で存在し得るカルボニル基を分離、定量するための吸光度標識試薬として(+)-2,2,2-トリフルオロ-1-フェニルヒドラジンが報告されている [Perriera, W. E. 等Aust. J. Chem., 24, 1103 (1971)]。この試薬による方法の特異性は高いが、蛍光標識法に比較し十分な測定感度を得ることができないという欠点がある。

【0004】

【発明の開示】本発明者等は、アルデヒドおよびケトン類に対して選択性が高く、光学異性体を識別できる化合物を得るべく、合成ならびにスクリーニングを重ねるなかで、(+)-4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールあるいは(-)-4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールの7位にアミノスルfonyl基、ジアルキルアミノスルfonyl基あるいはニトロ基を導入した新規な化合物がアルデヒドおよびケトン類に対する蛍光試薬として極めて優れており、かつ未反応の蛍光試薬等に影響されることなくカルボニル基を含有する光学異性体を高感度で分離定量することが可能であることを見出した。本発明はかかる知見に基づいてなされたものである。

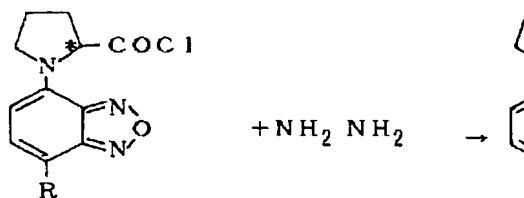
【0005】すなわち、本発明は、一般式 (I)

【化3】



[式中Rは、SO₂NR₁R₂（ただし、R₁、R₂は、それぞれ水素原子または低級アルキルである）またはNO₂であり、*は不育中心を意味する。]で表わされる4-（2-カルバゾイルピロリジン-1-イル）-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾールの新規な光学活性誘導体とその化合物からなる蛍光標識試薬を提供するものである。

【0006】本発明に係る上記式(I)で表される化合物は、文献未載の新規化合物であり、その製造方法としては、例えば下記の反応式Iに従って(+)-4-(2*



〔式中、R および* は、前記と同じ意味を有する〕

【0008】上記の式で表される反応において使用する溶媒としては、ベンゼン、トルエン、キシレン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、アセトン、アセトニトリル、ジオキサン、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、アセトニトリル、エタノール、メタノール等のごとき有機溶媒等が挙げられる。上記反応は、通常0-200℃の範囲内で行うことができるが、好ましくは5-50℃である。反応に要する時間は、反応温度、反応に供せられる化合物、溶媒等によって異なるが、通常は5分-12時間、好ましくは5分-3時間の範囲で適宜選択される。

【0009】反応混合物からの目的物の単離、精製は常法に従って容易に行うことができる。例えば、ヘキサン、ベンゼン、ジクロルメタン、クロロホルム、酢酸エチルのごとき有機溶媒による抽出、再結晶或いはシリカゲル、活性炭素、イオン交換樹脂、デキストラン架橋重合体、スチレンもしくはアクリル酸エステルの多孔質重合体等を用いた各種のクロマトグラフィーを適用して行うことができる。

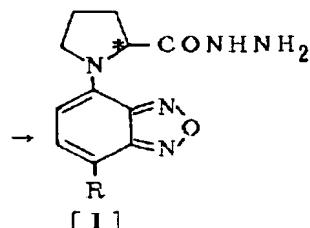
【0010】出発物質の (+)-4-(2-クロロホルミルピロリジン-1-イル)-7-ニトロ-、(-)-

*—クロロホルミルピロリジン-1-イル) —あるいは
(-) - 4 - (2-クロロホルミルピロリジン-1-イ
ル) - 2 - 1 - 3 - ベンゾオキサジアゾールヒドラジ

10 ントを反応させることにより、本発明の化合物である
(+)-4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-あるいは(-)-4-(2-カルバゾイルピロリ
ジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサジアゾ
ルの誘導体を得ることができる。

【0007】

【化4】

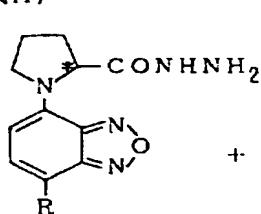
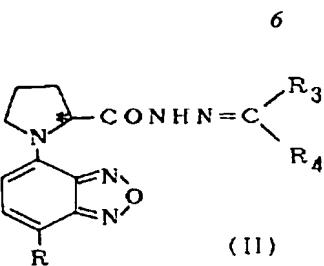


4-(2-クロロホルミルピロリジン-1-イル)-7-ニトロ-、(+)-4-(2-クロロホルミルピロリジン-1-イル)-7-(N, N-ジメチルアミノスルフォニル)-または(-)-4-(2-クロロホルミルピロリジン-1-イル)-7-(N, N-ジメチルアミノスルフォニル)-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール等は、既知化合物であり、豊岡等の方法 [Analys 118, 759 (1993)] 等に従って製造することができる。

【0011】本発明に係る化合物は、下記の反応式に示すごとく酸性触媒等の存在下で、アルデヒド類およびケトン類と選択的に反応結合し、対応する蛍光性のヒドラン誘導体を生成する(式II)。したがって、これを利用して、検体中の光学活性なアルデヒド類やケトン類と本発明に係る化合物とを反応させた後、生成する蛍光物質を液体クロマトグラフィーで分離し、測定することにより検体中の光学活性鏡像体をそれぞれ別々に検出でき、また標準物質により作成した検量線を用いてその定量を行うことが可能である。

【0012】

【化5】

5
(式II) $\begin{array}{c} R_3 \\ | \\ R_4-C=O \end{array}$ + R₃
R₄

(II)

【式中Rおよび*は、前記と同じ意味を有する。またR₃、R₄はHあるいはアルキルまたはフェニルおよびそれらの誘導体である。】酸性触媒としては、酢酸、塩酸、硫酸、硝酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等が用いられる。

【0013】本発明に係る化合物を蛍光標識試薬としてアルデヒド、ケトン等のカルボニル基を有する光学異性体を定量する際の好ましい条件は以下のとおりである。

【0014】1) 本発明の化合物とアルデヒド類、ケトン類との反応を酸性触媒の存在下で行わせる。

2) この際の反応溶媒は、ベンゼン、ジクロロメタン、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキサイド、エタノール、メタノール、水、好ましくはアセトニトリル、水およびアセトニトリル-水の混合溶液。

3) 反応温度は15℃以上、好ましくは30-80℃。

4) 反応時間は1分-10時間、好ましくは2分-6時間である。

【0015】5) 光学活性アルデヒドあるいはケトンと結合して得られたヒドラゾンの蛍光誘導体の分離は、液体クロマトグラフ法、薄層クロマトグラフ法、濾紙クロマトグラフ法、キャピラリ電気泳動法、ゲル電気泳動法等により、好ましくは液体クロマトグラフ法、キャピラリ電気泳動法により行い、その場合用いるカラムは、オクタデシル、オクチル、シアノプロピル、アミノプロピル、ハイドロキシプロピル、シリカゲルカラム、ヒドロキシアパタイトカラム、アルミナカラム等逆相系、順相系いずれでもよく、好ましくはオクタデシルカラム、シリカゲルカラムが有効である。また、溶離溶媒としては、水、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ベンゼン、ヘキサン等、好ましくは水、アセトニトリル、メタノールあるいはそれらの混合溶液、ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルあるいはそれらの混合溶液を用いる。

【0016】6) 蛍光誘導体を励起させ、生じた蛍光強度を測定するための検出器の励起波長は、400-500nm、好ましくは440-480nmであり、蛍光波長は510-600nm、好ましくは530-580nmである。

【0017】本発明に係る化合物の特徴を列記すると次のとくである。

【0018】1) アルデヒド類、ケトン類等のカルボ

ニル基に対して選択的に反応し、かつ反応性が高いので、アルデヒド類、ケトン類およびそれらの光学異性体を同時に分離、かつ高感度に検出、定量することができ、優れた蛍光標識試薬として極めて有用である。

【0019】2) この化合物の(+)体あるいは(-)体を使い分けることにより、光学活性なアルデヒド類およびケトン類[(+)体あるいは(-)体]の溶出位置を逆転させることができ、微量混在する光学異性体の一方を、多量に存在する光学異性体の他方よりクロマトグラム上で早く溶出させることができ、そのため、従来、多量に存在する光学異性体の妨害によって分離定量が不可能であった微量の光学異性体の一方を、精度良く測定することができる。

【0020】3) この化合物を還元糖の標識試薬として用いると、従来、特異的吸収を示さず十分な感度が得られなかつたため測定が困難であった還元糖を一斉に高感度で定量することができる。

4) 溶液状態での安定性が高く、室温で一週間、冷蔵庫中で一ヶ月以上安定性を保つ。

5) アルデヒド類、ケトン類と結合した蛍光誘導体は、pHに依存しないほぼ一定の蛍光極大波長および安定な蛍光強度をあたえる。

【0021】6) アルデヒド類、ケトン類との蛍光誘導体は安定性が高く、冷蔵庫中で一週間以上安定性を保つ。

7) 上記の蛍光誘導体は励起、蛍光極大波長が長波長域にあるため、通常の蛍光検出法のみならず、化学発光検出法やレーザー蛍光検出法によつても、光学活性なアルデヒド類およびケトン類の(+)体および(-)体のすべてを高感度に分離、検出することができる。

【0022】本発明の化合物は前述のとおりの特性から超微量(10⁻¹⁴~10⁻¹⁶モル)で存在する個々の光学活性なアルデヒド類、ケトン類について、その定性分析、定量分析に応用できるばかりでなく、広くカルボニル基を含有する医薬品、農薬、汚染物等の光学活性化合物の解析、定性、定量、あるいは、細胞、膜、組織等の生体中の光学活性アルデヒド類、ケトン類の分離、検出あるいは生体構成部分の構造と機能の関係についての検討に際しての種々の分泌液、その他の臨床試料中のアルデヒド類、ケトン類の定量に応用することができ、さらにこれらを基礎とした代謝、臨床分析それらの自動化の基礎技術あるいは生化学、生理学、および基礎、臨床にわたる医学的研究等に非常に広範囲にわたって応用

することができる。

【0023】本発明の化合物の中から、(+) - 4 - (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) - 7 - (N, N-ジメチルアミノスルフォニル) - 2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール(以下[(+)-DBD-Pr o C Z]と略記する)を代表例として取り上げ、アルデヒド(ベンズアルデヒド)との反応性および光学活性アルデヒド(2-フェニルプロピオナール)および光学活性ケトン(2-メチルサイクロヘキサノン)より生成した蛍光誘導体の液体クロマトグラフィーでの分離度(Rs)について行った実験例を以下に示す。

【0024】

【実験例】

例-1 (+)-DBD-Pr o C Zとベンズアルデヒドとの反応性

1. 蛍光標識試薬の調製

(+)-DBD-Pr o C Z 3.54 mgを全量が1.0 mlになるようにアセトニトリルに溶解した。

2. 被検サンプルの調製

ベンズアルデヒド 10.61 mgを全量が1.00 mlになるようにアセトニトリルに溶解した。次いでその溶液0.1 mlを分取し、アセトニトリル-水(7:3)を加え、全量を1.0 mlとした(10 μM)。

【0025】3. 酸性触媒溶液の調製

トリクロロ酢酸0.5 gにアセトニトリルを加えて溶かし全量を1.00 mlとした(0.5%)。

4. 上記2で調製したサンプルを0.4 ml分取し、これに、上記1、3で調製した蛍光標識試薬および触媒溶液をそれぞれ50 μl加え、全体を室温で5、20、35、50、65、80、95分間放置後、これらの各時間ごとの反応溶液について、以下に示す条件下で液体クロマトグラフ法により分離し、蛍光検出を行った。この結果を図1に示す。

【0026】装 置：島津LC-9A液体クロマトグラフ

カラム：イナートシルODS-2(150×4.6 mm, i. d., 5 μm)

カラム温度：40℃

溶出液：水/アセトニトリル(55/45)

注入量：5 μl

流 速：毎分1.0 ml

蛍光検出器：島津RF-550

検出波長：励起波長450 nm、蛍光波長535 nm

【0027】後掲図1から明らかのように35-50分後に反応が最大に達し、以後ほぼ一定の蛍光強度(収率)を示すことが認められた。

例-2 蛍光標識試薬と光学活性アルデヒド(2-フェニルプロピオナール)および光学活性ケトン(2-メチルサイクロヘキサノン)より生成した蛍光誘導体の分離度(Rs)の検討

1. 蛍光標識試薬の調製

(+)-DBD-Pr o C Z 3.54 mgを全量が1.0 mlになるようにアセトニトリルに溶解した。

2. 被検サンプルの調製

【0028】(A) (±)-2-フェニルプロピオナール 13.42 mgを全量が1.00 mlになるようにアセトニトリルに溶解した。次いでその溶液0.1 mlを分取し、アセトニトリル-水(7:3)を加え、全量を1.0 mlとした(10 μM)。

【0029】(B) (±)-2-メチルサイクロヘキサノン 1.22 mgを全量が1.00 mlになるようにアセトニトリルに溶解した。次いでその溶液0.1 mlを分取し、アセトニトリル-水(7:3)を加え、全量を1.0 mlとした(10 μM)。

3. 酸性触媒溶液の調製

トリクロロ酢酸0.5 gにアセトニトリルを加えて溶かし全量を1.00 mlとした(0.5%)。

【0030】4. 上記2で調製したサンプルを0.4 ml分取し、これに、上記1、3で調製した蛍光標識試薬

および触媒溶液をそれぞれ50 μl加え、65℃で5分間反応させた後、それらの反応溶液を以下に示す条件下に液体クロマトグラフ法により分離し、蛍光検出した。蛍光標識されたアルデヒドあるいはケトンの光学異性体のピークの溶出時間を測定し、下記の式にしたがって分離度(Rs)を計算した。その結果を表1に示す。

【0031】装 置：島津LC-9A液体クロマトグラフ

カラム：イナートシルSIL(150×4.6 mm, i. d., 5 μm) [2-フェニルプロピオナールを反応させたとき]

カラム温度：40℃
溶出液：n-ヘキサン/酢酸エチル(6:4) [2-フェニルプロピオナールを反応させたとき]
水/アセトニトリル(6/4) [2-メチルサイクロヘキサノンを反応させたとき]

注入量：5 μl
40 流 速：毎分1.0 ml

蛍光検出器：島津RF-550

検出波長：励起波長450 nm、蛍光波長535 nm

$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / W_1 + W_2$

t_{R1}, t_{R2} ：それぞれ、蛍光標識されたジアステレオマーの溶出時間を表わす。W₁, W₂：それぞれ、蛍光標識されたジアステレオマーのピーク幅を表わす。

【0032】

【表1】

9
表 1

光学異性体	Rs 値
2-フェニルプロピオナール	0.95
2-メチルサイクロヘキサン	0.87

【0033】例-3 蛍光標識試薬とアルデヒドとの反応により生成した蛍光誘導体の検出能の検討

1. 蛍光標識試薬の調製

(+) -DBD-Pr o C Z 3. 54 mg を全量が 1. 0 ml になるようにアセトニトリルに溶解した。

2. 被検サンプルの調製

n-ブタナール 7. 21 mg, n-ペンタナール 8. 61 mg, n-ヘキサン 10. 02 mg, n-ペプタナール 11. 42 mg, n-オクタナール 12. 82 mg, n-ノナナール 14. 22 mg の混合溶液にアセトニトリルを加えて溶かし全量が 100 ml とした。次いでその溶液 0. 1 ml を分取し、アセトニトリル-水 (7:3) を加え、全量を 10 ml とした (それぞれ 10 μ M)。

【0034】3. 酸性触媒溶液の調製

トリクロロ酢酸 0. 5 g にアセトニトリルを加えて溶かし全量を 100 ml とした (0. 5%)。

4. 上記 2 で調製したサンプルを 0. 4 ml 分取し、これに、上記 1、3 で調製した蛍光標識試薬および触媒溶液をそれぞれ 50 μ l 加え、65 °C で 5 分間反応させた後、それらの反応溶液を以下に示す条件下に液体クロマトグラフ法により分離し、蛍光検出した。その結果を図 2 に示す。

【0035】装置：島津 LC-9 A 液体クロマトグラフ

カラム：イナートシル ODS-2 (150 × 4. 6 mm, i. d., 5 μ m) カラム温度：40 °C

溶出液：(A) 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7. 1) / アセトニトリル (50/50)

(B) 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7. 1) / アセトニトリル (30/70)

溶出法：リニアグラジェント法により、20 分間で A 100% から B 100% とする。

注入量：2 μ l

流速：毎分 1. 0 ml

蛍光検出器：島津 RF-550

検出波長：励起波長 450 nm, 蛍光波長 535 nm

後掲図 2 に示された各脂肪アルデヒドの誘導体のピークは 1.6 ピコモル (1.6×10^{-12} モル) に相当する。

このクロマトグラムより算出した検出限界は、およそ 50 フェムトモル (5×10^{-14} モル) であった。

【0036】本発明に係る化合物とアミン類との反応に

より生成した蛍光誘導体は、励起波長および蛍光波長が共に長波長であるため、生体試料を取扱う場合には、励起波長および蛍光波長が比較的短波長域 (400 nm 以下) にある生体成分の影響を受けにくく、微量物質の測定に際し、再現性の良いデータを得ることができる。また未反応の蛍光試薬や触媒等をあらかじめ除去するというような繁雑な前処理操作が不要であることも優れた特徴の一つである。さらに順相系、逆相系の両方で分離、検出することができる。また通常の蛍光法での検出限界は約 10 フェムトモル (10^{-14} モル) と十分高感度であるが、化学発光法やレーザー蛍光法により更に 10-100 倍感度の向上がはかられる。次に実施例によつて本発明に係る化合物の合成法を説明する。

【0037】

【実施例】

実施例 1

(+) -4- (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) -7- (N, N-ジメチルアミノスルフォニル) -2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(+) -DBD-Pr o C Z] と略記する) および (-) -4- (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) -7- (N, N-ジメチルアミノスルフォニル) -2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(-) -DBD-Pr o C Z] と略記する) の合成

【0038】ヒドラジン・1 水和物 70 mg (1. 4 mmol) を含むメタノール溶液 100 ml に (+) -4- (2-クロロホルミルピロリジン-1-イル) -7- (N, N-ジメチルアミノスルフォニル) -2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(+) -DBD-Pr o -C O C I] と略記する) 130 mg (0. 36 mmol) を溶かした無水ベンゼン溶液 25 ml を攪拌下ゆっくり滴下する。室温で約 30 分間攪拌反応後、反応液中の溶媒を減圧留去する。残渣にメタノール/酢酸エチル (1:9) の混合溶液を加えて再結晶し、(+)-DBD-Pr o C Z の黄色結晶 147 mg を得た (収率 91%)。

【0039】(+)-DBD-Pr o C Z の主な物性値は次のとおりである。

融点 102-109 °C (分解); IR (KBr) 1640, 1600, 1555, 1415, 1340, 1140, 970 cm⁻¹; ¹H-NMR (重クロロホルム) ppm, 7. 74 (1H, d), 6. 07 (1H, d), 4. 98 (1H, bs), 3. 95-4. 10 (3H, m), 3. 6-3. 8 (2H, m), 2. 8 (6H, s), 2. 3-2. 45 (2H, m), 2. 1-2. 3 (2H, m)。

(-) -4- (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) -7- (N, N-ジメチルアミノスルフォニル) -2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(-) -DBD-Pr o C Z] と略記する) も (-) -4- (2-ク

11

クロロホルミルピロリジン-1-イル) -7- (N, N-ジメチルアミノスルフォニル) -2, 1, 3-ベンゾキサジアゾール ([(-) -DBD-Pr o-COC 1] と略記する) から同様に合成することができる。

【0040】実施例-2

(+) -4- (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) -7-ニトロ-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール (以下 [(+) -NBD-Pr oCZ] と略記する) および (-) -4- (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) -7-ニトロ-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール (以下 [(-) -NBD-Pr oCZ] と略記する) の合成

【0041】ヒドラジン・1水和物 3.5 mg (0.7 mmol) を含むメタノール溶液 10.0 ml に (+) -4- (2-クロロホルミルピロリジン-1-イル) -7-ニトロ-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(+) -NBD-Pr o-COC 1] と略記する) 5.0 mg (0.17 mmol) を溶かした無水ベンゼン溶液 1.5 mg を攪拌下ゆっくり滴下する。室温で約 30 分間攪拌反応後、反応液中の溶媒を減圧留去する。残渣に水 2.0 ml および酢酸エチル 1.5 ml を加え抽出する。同様な抽出操作を 2 回繰り返す。酢酸エチル抽出液を合せ溶媒を減圧留去した後メタノール/酢酸エチル (1:1) の混合溶液を加えて再結晶し、 (+) -NBD-Pr oCZ の赤色結晶 1.5 mg を得た (収率 30

%)。

【0042】 (+) -NBD-Pr oCZ の主な物性値は次のとおりである。

融点 117-121°C; IR (KBr) 1675, 1615, 1555, 1320, 1290, 1260 cm⁻¹; ¹H-NMR (重クロロホルム) ppm, 8.41 (1H, d), 7.50 (1H, bs), 6.12 (1H, d), 5.20 (1H, bs), 3.6-4.2 (4H, m), 2.1-2.6 (4H, m)。

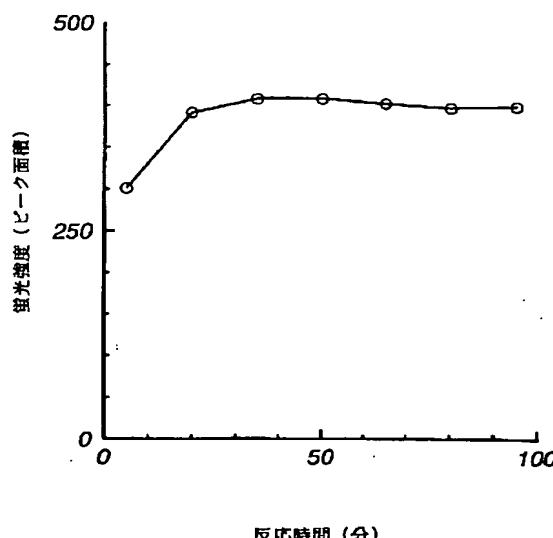
【0043】 (-) -4- (2-カルバゾイルピロリジン-1-イル) -7-ニトロ-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(-) -NBD-Pr oCZ] と略記する) も (-) -4- (2-クロロホルミルピロリジン-1-イル) -7-ニトロ-2, 1, 3-ベンゾオキサジアゾール ([(-) -NBD-Pr o-COC 1] と略記する) から同様に合成することができる。

【図面の簡単な説明】

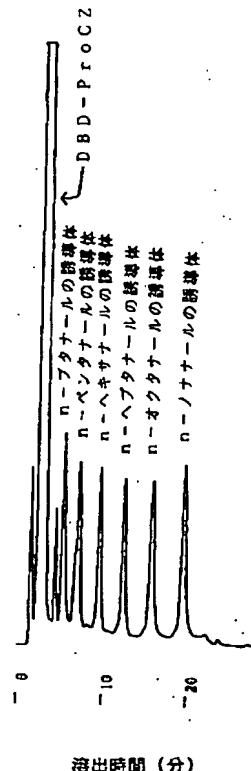
【図1】本発明に係る化合物の一つである (+) -DBD-Pr oCZ とベンズアルデヒドを反応させたときの反応時間と蛍光強度 (収率) の関係を示すグラフである。

【図2】本発明に係る化合物の一つである (+) -DBD-Pr oCZ と脂肪族アルデヒドとの混合溶液を反応させたときに得られた混合物のクロマトグラムである。

【図1】



【図2】



正誤表

(平成8年5月21日発行)

特許公開番号	分類	識別記号	箇所	誤	正
平 3-128370	C07D 285/135		発明者住所 (1人目) 出願人 (1人目) (目次共)	アメリカ合衆国、ニューヨーク 11803, ブレインビュー、シャーウッド ドライブ 14 オブティカル ラディエーション コーポレーション アメリカ合衆国、カリフォルニア 91702, アズーサ, オブティカル ドライブ 1300 脱落	アメリカ合衆国、ニューヨーク 11803, ブレインビュー、シャーウッド ドライブ 14 セイモア エフ. トレイガーアメリカ合衆国、ニューヨーク 11803, ブレインビュー、シャーウッド ドライブ 14 ジ. マイケル ブラックバーン
平 3-135952	C07C 311/46		出願人 (2人目) (目次共)	オブティカル ラディエーション コーポレーション アメリカ合衆国、カリフォルニア 91702, アズーサ, オブティカル ドライブ 1300	イギリス国、シェフィールド エス10 4エフエイ, クリミカーレーン 23 ジ. マイケル ブラックバーン
平 7-224061	C07D 413/04	207	発明の名称	4-(2-カルバゾイルビロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサシアゾールの新規光学活性誘導体	4-(2-カルバゾイルビロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサシアゾールの新規光学活性誘導体
平 7-252201	C07O 271/12		出願日	昭和61年(1986)12月11日	平成6年(1994)3月14日

正誤表

(平成8年9月17日発行)

特許公開番号	分類	識別記号	箇所	誤	正
平 5-112501	C07C 211/45		出願日	3年(0000)10月22日	平成3年(1991)10月22日
平 7-224061	C07D 413/04	207	発明の名称 (目次共)	4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサシアゾールの新規光学活性誘導体	4-(2-カルバゾイルピロリジン-1-イル)-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールの新規光学活性誘導体
平 7-291806	A01N 25/22		優先日	1994年4月23日	1993年4月23日
平 8- 41078	C07F 7/10		発明者 (一人目)	脱落	山下 浩 茨城県つくば市東1丁目1番 工業技術院物質工学工業技術 研究所内
平 8- 81384	A61K 35/78	ADZ	新規性喪失 の例外規定 適用の表示	特許法第30条第1項適用申請 有り 1994年3月20日、(財) 日本食品分析センター発行の 「日本食品工業学会第41回大 会講演集」に発表	特許法第30条第1項適用申請 有り 1994年3月20日、(財) 日本食品分析センター内日本 食品工業学会関東支部発行の 「日本食品工業学会第41回大 会講演集」に発表